

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA P  
Bureau interna

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAIT

WO 9606934A1

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :

C12N 15/50, C07K 14/165, A61K 39/215

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 96/06934

(43) Date de publication internationale:

7 mars 1996 (07.03.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01128

(22) Date de dépôt international: 28 août 1995 (28.08.95)

(30) Données relatives à la priorité:

94/10379

29 août 1994 (29.08.94)

FR

(71) Déposant: RHONE MERIEUX [FR/FR]; 17, rue de Bourgelat,  
F-69002 Lyon (FR).(72) Inventeurs: DARTEIL, Raphaël; 29, rue de Marseille, F-69007  
Lyon (FR). CORAPI, Wayne; c/o J.V. Corapi, 138 King-  
dom Avenue, Staten Island, NY 10312 (US). AUDONNET,  
Jean-Christophe; Francis, 130, rue Duguesclin, F-69006  
Lyon (FR). CHAPPUIS, Gilles-Emile; 3, rue Laurent-  
Vibert, F-69006 Lyon (FR).(74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc.; Cabinet Lavoix, 2,  
place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).(81) Etats désignés: AU, BR, CA, JP, brevet européen (AT, BE,  
CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si de telles modifications sont  
reçues.**+ nationalité : USA*

(54) Title: INFECTIOUS PERITONITIS VACCINE

(54) Titre: VACCIN DE LA PERITONITE INFECTIEUSE FELINE

(57) Abstract

Nucleotide sequences comprising the FIPV S gene or a fragment thereof, modified in at least one of the A1 and A2 antigenic regions involved in the enhancement, and use of these sequences for the expression of modified proteins and the construction of recombinant viruses or expression plasmids. The invention also concerns the use of these recombinant viruses in the form of vaccines to produce immunity to feline infectious peritonitis, the use of these expression plasmids in an immunity-producing composition by directly injecting the plasmids into the cat, and use of these modified proteins in the form of a vaccine.

(57) Abrégé

L'invention comprend les séquences nucléotidiques comprenant le gène FIPV S, ou un fragment de ce gène, modifiées dans l'une au moins des régions antigéniques A1 et A2 impliquées dans la facilitation, ainsi que l'utilisation de ces séquences pour l'expression de protéines modifiées, et pour la construction de virus recombinants ou de plasmides d'expression, et l'utilisation des virus recombinants comme vaccins contre la péritonite infectieuse féline, l'utilisation des plasmides d'expression comme composition immunisante par injection directe desdits plasmides chez le chat, et l'utilisation des protéines modifiées comme vaccin.

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche                  | GB | Royaume-Uni                                | MR | Mauritanie            |
| AU | Australie                 | GE | Géorgie                                    | MW | Malawi                |
| BB | Barbade                   | GN | Guinée                                     | NE | Niger                 |
| BE | Belgique                  | GR | Grèce                                      | NL | Pays-Bas              |
| BF | Burkina Faso              | HU | Hongrie                                    | NO | Norvège               |
| BG | Bulgarie                  | IE | Irlande                                    | NZ | Nouvelle-Zélande      |
| BJ | Bénin                     | IT | Italie                                     | PL | Pologne               |
| BR | Brazil                    | JP | Japon                                      | PT | Portugal              |
| BY | Bélarus                   | KE | Kenya                                      | RO | Roumanie              |
| CA | Canada                    | KG | Kirghizistan                               | RU | Fédération de Russie  |
| CF | République centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan                |
| CG | Congo                     | KR | République de Corée                        | SE | Suède                 |
| CH | Suisse                    | KZ | Kazakhstan                                 | SI | Slovénie              |
| CI | Côte d'Ivoire             | LI | Liechtenstein                              | SK | Slovaquie             |
| CM | Cameroun                  | LK | Sri Lanka                                  | SN | Sénégal               |
| CN | Chine                     | LU | Luxembourg                                 | TD | Tchad                 |
| CS | Tchécoslovaquie           | LV | Lettonie                                   | TG | Togo                  |
| CZ | République tchèque        | MC | Monaco                                     | TJ | Tadjikistan           |
| DE | Allemagne                 | MD | République de Moldova                      | TT | Trinité-et-Tobago     |
| DK | Danemark                  | MG | Madagascar                                 | UA | Ukraine               |
| ES | Espagne                   | ML | Mali                                       | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FI | Finlande                  | MN | Mongolie                                   | UZ | Ouzbékistan           |
| FR | France                    |    |  | VN | Viet Nam              |
| GA | Gabon                     |    |  |    |                       |

## VACCIN DE LA PERITONITE INFECTIEUSE FELINE

### Domaine de l'invention

5

La présente invention a trait à des vaccins contre la Péritonite Infectieuse Féline (PIF) préparés à partir de la glycoprotéine SPIKE (S) du virus de la PIF dont les épitopes facilitants majeurs ont été modifiés par mutagénèse. Ces vaccins permettent une protection des chats vaccinés contre la PIF sans provoquer chez ces derniers le phénomène de facilitation qui conduit à une évolution accélérée de la maladie.

10

### Etat de l'art antérieur

15

Le virus de la Péritonite Infectieuse Féline (FIPV = Feline Infectious Peritonitis Virus) est un virus à ARN simple brin positif, enveloppé, qui, au sein de la famille des Coronaviridae, appartient au groupe antigénique qui

comprend le coronavirus félin entérique (FECV), le coronavirus canin (CCV), le virus de la gastroentérite transmissible du porc (TGEV) et le coronavirus respiratoire porcin (PRCV) (Sanchez C. et al. Virology, 1990, 174, 410-417). Ce virus provoque une maladie complexe et toujours mortelle chez les chats, connue sous le nom de Péritonite Infectieuse Féline (PIF). Le virus de la PIF se singularise au sein des coronavirus parce qu'il induit chez le chat l'apparition d'anticorps facilitant l'infection par le virus et accélérant l'évolution de la maladie. Des chats possédant des anticorps neutralisant anti-FIPV suite à une infection naturelle antérieure par ce virus, suite à un transfert passif d'anticorps ou suite à une vaccination, développent très fréquemment une maladie beaucoup plus intense et beaucoup plus rapide que celle de chats simplement infectés pour la première fois en l'absence d'anticorps spécifiques (Pedersen N. et Boyle J., Am. J. Vet. Res. 1980, 41, 868-876 ; Weiss R. et al., Comp. Immunol. Microb. Infect. Dis. 1981, 4, 175-189 ; Weiss R. et al., Am. J. Vet. Res. 1980, 41, 663-671). On pense que la liaison des immuns complexes anticorps-virus aux récepteurs Fc présents à la surface des macrophages constitue le mécanisme qui facilite l'accélération de l'entrée du virus dans les cellules et sa diffusion rapide au sein de l'organisme (Porterfield, J. Advances in Virus research, 1986, 31, 335-355 ; Weiss et al. 1981). Ce phénomène de facilitation n'a été observé au sein des coronavirus qu'avec le virus de la PIF.

Le virus de la PIF comprend trois protéines structurales. La plus importante en taille est la protéine "SPIKE" ou spicule (S). Cette protéine S est fortement glycosylée et c'est elle qui induit chez le chat à la fois des anticorps neutralisants et des anticorps facilitants. Des études *in vitro* réalisées avec des anticorps

monoclonaux neutralisants dirigés contre le virus de la PIF ont montré que les épitopes neutralisants majeurs sont tous situés sur la glycoprotéine S et qu'ils correspondent, à un large degré, aux épitopes impliqués dans le phénomène de facilitation (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705 ; Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965).

Une vaccination efficace contre la PIF doit conduire à l'apparition d'anticorps neutralisants sans qu'il y ait induction d'anticorps facilitants. Un tel vaccin n'a jamais pu être mis au point jusqu'ici. Les vaccins recombinants qui ne contiennent pas la glycoprotéine S peuvent probablement fournir la meilleure alternative pour les vaccins PIF futurs, mais ces antigènes ne contribuent que partiellement à l'induction de la réponse neutralisante contre le virus PIF. Des trois antigènes viraux structuraux, seule la glycoprotéine S est capable d'induire une importante réponse neutralisante. Malheureusement, cette glycoprotéine induit aussi l'apparition concomitante d'anticorps facilitants. Malgré son importance dans l'induction d'une bonne réponse neutralisante (et donc dans la réponse protectrice), la glycoprotéine S naturelle semble jouer un rôle essentiel dans le phénomène de facilitation de la PIF et ne peut donc être utilisée pour l'instant pour la fabrication de vaccins répondant aux critères exposés plus haut.

La localisation et la caractérisation des épitopes présents sur S et en particulier ceux responsables de la neutralisation et de la facilitation est donc nécessaire pour déterminer les modifications à apporter à la glycoprotéine S (ou au gène qui code pour cette protéine) pour en faire un immunogène efficace pour la vaccination des chats contre la PIF.

La séquence nucléotidique et la séquence protéique de la glycoprotéine S du virus de la PIF ont été

déterminées (de Groot R. et al. EP-A-0 264 979). Cette demande de brevet n'enseigne pas comment identifier les épitopes neutralisants et/ou les épitopes facilitants sur S. Ce document n'enseigne pas non plus comment utiliser la séquence de S pour fabriquer un vaccin efficace et non facilitant contre la PIF.

La demande de brevet PCT WO-A-93/23421 revendique l'utilisation d'une glycoprotéine S tronquée ou d'une séquence d'acide nucléique ne codant que pour une partie de S. En particulier, la région très conservée située à l'extrémité carboxy-terminale de S (124 derniers acides aminés) est revendiquée pour la préparation d'un vaccin "universel" contre les coronavirus. Ce document est très général et n'enseigne pas comment réaliser un vaccin PIF qui n'induisse pas d'anticorps facilitants chez le chat. Il en va de même de la demande de brevet PCT WO-A-93/23 422 qui décrit des constructions mixtes de glycoprotéine S chimère FECV-FIPV incluant des fragments de FIPV S 542-597, 594-1454 ou 651-1454.

La demande de brevet PCT WO-A-92/08487 revendique l'utilisation de divers peptides sélectionnés sur les protéines S, ou codés par les gènes S, de diverses souches de virus FIPV ou par la séquence du gène S de FECV, à des fins de diagnostic, de traitement ou de prévention de la PIF chez le chat. En particulier, le peptide 598-615 de la séquence protéique de S du virus FIPV souche 79-1146 est revendiqué pour être utilisé sous la forme d'une protéine de fusion avec la galactokinase, protéine recombinante pouvant être utilisée ensuite pour le diagnostic des anticorps anti-PIF chez les chats infectés ou comme vaccin recombinant pour induire une protection contre la PIF chez les chats. Bien qu'envisageant des variations dans les séquences des peptides revendiqués, ce document n'enseigne pas précisément quels doivent être les changements dans les

séquences proposées, et n'enseigne ni comment réaliser un vaccin PIF non facilitant, ni quelles sont les régions de la glycoprotéine S impliquées dans ce phénomène.

La demande de brevet GB-A-2 282 601, publiée après la date de priorité de la présente demande, propose de réaliser un vaccin à base d'une protéine S modifiée pour éviter la facilitation, par modification ou délétion de l'un au moins des sites antigéniques dénommés D (correspond aux acides aminés 496-524), A1 (correspond aux acides aminés 531-555) et A2 (correspond aux acides aminés 584-604), de manière à rendre ces sites antigéniquement inactifs.

Des efforts importants ont été réalisés pour identifier les sites antigéniques majeurs présents sur les protéines S du virus TGEV (Transmissible Gastro-Enteritis Virus) (Correa I. et al., J. Gen. Virol. 1990, 71, 271-279 ; Delmas B. et al., J. Gen. Virol. 1990, 71, 1313-1323), BCV (Bovine CoronaVirus) (Yoo D. et al., Virology 1991, 183, 91-98), MHV (Mouse Hepatitis Virus) (Takase-Yoden S. et al., Virus Res. 1990, 18, 99-108 ; Stuhler A. et al., J. Gen. Virol. 1991, 72, 1655-1658) et FIPV (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705 ; Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965 ; Olsen C. et al., J. Gen. Virol. 1993, 74, 745-749). Dans tous les cas, de multiples domaines neutralisants ont été identifiés, et les domaines immunodominants ont été généralement localisés sur la partie S1 de la protéine.

Les études portant spécifiquement sur le virus de la PIF ont montré l'existence sur la protéine S d'épitopes induisant à la fois une réponse neutralisante et une réponse facilitante vis-à-vis de l'infection avec FIPV (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705 ; Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965 ; Olsen C. et al., J. Gen. Virol. 1993, 74, 745-749). Ces mêmes auteurs ont

montré que les anticorps monoclonaux neutralisants et facilitants de spécificité anti-S pouvaient être répartis en 6 groupes principaux selon leur capacité à reconnaître différentes souches de virus PIF et différents mutants résistants à la neutralisation par ces monoclonaux (mutants "mar" (monoclonal antibody resistant)). Toutefois, les épitopes correspondant aux régions antigéniques majeures sur FIPV S n'ont pas été caractérisés. Tous les anticorps monoclonaux non neutralisants décrits par ces auteurs (Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965) sont également non facilitants dans un test de facilitation *in vitro*, ce qui renforce l'hypothèse d'une relation étroite entre neutralisation et facilitation dans le cas du virus de la PIF. La facilitation de l'infection virale par les anticorps survient lorsque les monocytes ou les macrophages sont infectés plus efficacement par les immuns complexes, par une endocytose dépendante de récepteurs spécifiques, que par le virus seul. Malgré toutes les études réalisées sur le phénomène de facilitation dépendant des anticorps, de nombreuses questions restent sans réponse. En particulier, on ne sait pas quels sont les composants viraux spécifiques responsables de la facilitation pour chaque virus. Les études réalisées jusqu'ici chez FIPV indiquent que la facilitation dépend essentiellement d'épitopes présents sur S (Olsen C. et al. 1993 ; Vennema H. et al., J. Virol. 1990, 64, 1407-1409).

Hohdatsu T. et al. (Arch. Virol. 1991, 120, 207-217) ont trouvé que des anticorps monoclonaux anti-FIPV M pouvaient induire une facilitation de l'infection *in vitro*. Ceci n'a pas été confirmé *in vivo* avec les études réalisées avec des recombinants vaccine/FIPV M et vaccine/FIPV N. L'immunisation de chats avec ces deux recombinants n'a pas permis d'observer une facilitation induite par l'un ou l'autre de ces deux protéines (Vennema H. et al. 1990). Si



M et N jouent un rôle dans la facilitation, c'est certainement à un degré très inférieur à celui joué par S. Au cours des études réalisées avec les différents systèmes viraux où la facilitation peut être observée, un fait constant a été mis en évidence : des épitopes individuels sont capables d'induire à la fois des anticorps neutralisants et des anticorps facilitants. Ceci a été démontré pour FIPV (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705 ; Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965 ; Hohdatsu T. et al., Arch. Virol. 1991, 120, 207-217), pour le virus de la dengue (Morens D. et Halstead S., J. Gen. Virol. 1990, 71, 2909-2917), et pour HIV (Robinson W. Jr., J. Virol. 1991, 65, 4169-4176).

Les résultats récents des tests réalisés avec des vaccins PIF expérimentaux semblent fournir l'argument le plus solide à ce jour pour l'existence d'une relation directe entre la facilitation observée *in vitro* et la maladie accélérée *in vivo* chez le chat. L'inoculation de chats avec des recombinants du virus de la vaccine exprimant la protéine S de la souche FIPV 79-1146 sensibilise les chats et induit après épreuve une maladie accélérée chez les chats vaccinés par rapport aux chats témoins non vaccinés (Vennema H. et al., J. Virol. 1990, 64, 1407-1409). L'inoculation de recombinants vaccine exprimant soit la protéine M, soit la protéine N, n'a pas prédisposé les chats à une maladie accélérée. Ces résultats *in vivo* sont à mettre en parallèle avec les résultats *in vitro* démontrant une localisation majoritaire des épitopes facilitants sur S (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705 ; Olsen C. et al., J. Virol. 1992, 66, 956-965). De plus, des expériences récentes réalisées pour étudier l'efficacité d'un autre candidat vaccin pour la PIF ont démontré une association statistiquement significative entre la capacité d'un sérum de chat à induire une

facilitation *in vitro* et le développement chez le même chat d'une maladie accélérée (Olsen C., Vet. Microb. 1993, 36, 1-37).

#### Description de l'invention

5 La présente invention a pour objet la caractérisation des épitopes impliqués dans la facilitation de l'infection par le virus de la PIF. La connaissance précise des structures moléculaires responsables du mécanisme de facilitation permet de concevoir des antigènes  
10 n'induisant pas l'apparition d'anticorps facilitateurs. Ces antigènes sont les composants essentiels d'un vaccin PIF efficace.

De manière surprenante, il a été découvert, par analyse de la séquence du gène S de virus FIPV mutants  
15 résistants à la neutralisation par des anticorps monoclonaux neutralisants et facilitateurs, ou résistants à des anticorps monoclonaux uniquement neutralisants et non facilitateurs, qu'il était possible de contourner le mécanisme d'induction de la facilitation par la  
20 glycoprotéine S. Deux sites antigéniques majeurs ont été caractérisés avec les anticorps monoclonaux étudiés : A1 et A2. Ces sites sont de manière surprenante situés tous les deux dans la même région de la protéine S. Il semble que les anticorps fortement neutralisants et facilitateurs  
25 reconnaissent les deux sites en même temps. Cette information suggère que la liaison simultanée des deux épitopes par un même anticorps joue un rôle direct dans la facilitation. En effet, parallèlement à cette première découverte, il a été découvert que les anticorps  
30 neutralisants, mais non facilitateurs, ne reconnaissent que le site A2. La facilitation serait donc due à une modification conformationnelle par rapprochement entre les deux épitopes A1 et A2. La région A2 inclut les acides aminés 637-662 sur la séquence protéique de S (De Groot R.

et al., J. Gen. Virol. 1987, 68, 2639-2646). La nature hydrophile de cette région et le fait que les 3 anticorps monoclonaux testés reconnaissent tous ce petit domaine suggèrent que A2 est un épitope neutralisant dominant de la protéine S. Par ailleurs, l'étroite homologie mise en évidence entre le site A1 et une partie du sous-site Aa identifié sur la protéine S de TGEV (Gebauer F. et al., Virology 1991, 183, 225-238) suggère que A1, qui comprend les acides aminés 562-598 doit être également un important épitope neutralisant pour le virus FIPV.

Le rapprochement ou la liaison simultanée, par un même anticorps, des sites A1 et A2 est nécessaire pour induire la facilitation par l'intermédiaire des anticorps.

La présente invention a pour objet la modification par génie génétique de la séquence du gène FIPV S dans la région des sites A1 et/ou A2, en particulier pour modifier l'un au moins des deux sites, de préférence le site A1 de manière que la protéine exprimée présente un épitope modifié, de telle sorte qu'elle n'induisse plus d'anticorps facilitants et/ou le site A2. La région A1 peut être modifiée de diverses façons avec les moyens bien connus de l'homme de l'art. On peut modifier les sites A1 ou A2 indépendamment ou simultanément.

La modification du site A2 peut consister en une modification, telle qu'une délétion totale, entraînant une perte d'antigénicité du site, mais on préfère que, comme pour le site A1, la modification exprime un épitope modifié de telle sorte que la protéine n'induisse plus d'anticorps facilitants.

La région A1 a une partie commune avec la région dénommée "A2" dans la demande de brevet GB-A-2 282 601 (WO-A-95/07987) citée plus haut, mais contrairement à l'invention, celle-ci prévoit des mutations (modifications) ou des délétions entraînant une perte de l'antigénicité de

la région modifiée ou délétée.

L'invention a donc en particulier pour objet une séquence nucléotidique comprenant le gène FIPV S complet, présentant au moins une modification, de préférence  
5 mutation et/ou délétion limitée, dans la région antigénique A2 qui code pour les acides aminés 637 à 662 et/ou dans la région antigénique A1 qui code pour les acides aminés 562 à 598, à l'exception, au moins pour le site A1, d'une délétion totale ou d'une mutation ou  
10 délétion importante ayant les mêmes conséquences qu'une délétion totale, à savoir une perte de l'antigénicité de la région modifiée.

La présente demande se trouve donc maintenant limitée à la partie de l'invention qui concerne les  
15 modifications permettant de supprimer l'induction d'anticorps facilitants sans supprimer l'antigénicité, au moins pour le site A1.

Bien entendu l'expression séquence nucléotidique comprenant le gène FIPV S complet recouvre les souches FIPV  
20 types 1 et 2 ainsi que les variants et les séquences qui présentent des variations secondaires, c'est-à-dire qui ne touchent pas à l'immunogénicité de la protéine S, ce qui couvre aussi des mutations et délétions secondaires en dehors des sites A1 et A2. De préférence, les variations de  
25 la séquence ne doivent pas modifier la fonctionnalité de la glycoprotéine S.

Cela inclut donc les séquences possédant un degré d'homologie élevé avec les séquences précédentes, y compris en tenant compte de la dégénérescence du code  
30 génétique, cette homologie étant suffisamment élevée pour que le polypeptide exprimé permette d'induire une protection vaccinale efficace.

Par délétion limitée, on entend de préférence une délétion ponctuelle (correspondant à 1 acide aminé) ou une

microdélétion (jusqu'à 6 acides aminés).

On évitera en général les mutations ou délétions des codons codant pour les cystéines situés dans A1 et A2.

On préférera en outre les mutations ponctuelles et en second lieu les délétions ponctuelles (sauf Cys) aux mutations et délétions plus étendues.

Pour le site A1, les modifications comprennent *a minima* une mutation pour l'un au moins et, de préférence, les deux codons codant pour Asp 568 et pour Asp 591 pour avoir tout autre acide aminé à ces positions. A la condition que les acides aminés 568 et 591 ne soient pas des Asp, tout autre acide aminé dans la région 562-598 peut être substitué à l'acide aminé naturel de la position considérée.

Les modifications du site A1 comprennent aussi les délétions limitées de cette région comprenant les acides aminés 568 et/ou 591.

Pour le site A2, les modifications comprennent *a minima* une mutation pour l'un au moins, et de préférence, les trois codons codant pour Asp 643, Arg 649 et Arg 656 pour avoir tout autre acide aminé à ces positions. Les modifications du site A2 comprennent aussi la délétion totale ou les délétions partielles de cette région comprenant les acides aminés 643, 649 et/ou 656.

La présente invention a encore pour objet l'utilisation des gènes FIPV ainsi modifiés pour l'expression *in vitro* de protéines FIPV S recombinantes et pour la préparation de vaccins sous-unités purifiées pour la vaccination des chats contre la PIF.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation des gènes FIPV S ainsi modifiés pour la construction de vecteurs viraux recombinants exprimant ces gènes modifiés. Ces vecteurs viraux peuvent être des virus recombinants répliatifs ou non répliatifs et plus

particulièrement des poxvirus (exemple : virus de la vaccine et ses dérivés, canarypox virus...), des herpèsvirus (herpèsvirus félin en particulier), ou des adénovirus.

5 La présente invention a pour objet la préparation de vaccins contre la PIF avec ces virus recombinants.

La présente invention a encore pour objet l'immunisation de chats contre la PIF avec des plasmides contenant les gènes FIPV S, modifiés selon la présente invention, et placés sous le contrôle d'un promoteur fort  
10 (par exemple HCMV IE, SV40, etc.) et de signaux de régulation pour la transcription et la traduction. Les plasmides se trouvent dans un véhicule susceptible de permettre l'injection directe chez le chat, notamment par  
15 voie intramusculaire. Il s'agit notamment de plasmides nus tels que décrits dans la demande de brevet internationale WO 90/11092.

La présente invention a enfin pour objet la préparation de vaccins contre la PIF comprenant une (ou  
20 des) protéine(s) FIPV S, modifiée(s) selon la présente invention, de préférence associée(s) à d'autres protéines du virus FIPV telles que par exemple la protéine M.

Une autre solution vaccinale consiste à utiliser des cellules (en particulier d'origine féline) exprimant  
25 constitutivement la glycoprotéine S selon l'invention.

#### Exemples :

**Exemple 1 : Clonage et expression des fragments du gène FIPV S.**

30 Dans le but de localiser la région du gène FIPV S responsable pour la neutralisation et pour la facilitation, le clonage de fragments chevauchants du gène FIPV S a été entrepris de manière à exprimer ces fragments sous forme de protéines de fusion avec la protéine du gène 10 du phag

5 T7. La séquence des oligonucléotides pour l'amplification des différents fragments a été choisie de manière à couvrir l'ensemble de la région codante du gène S en 3 grands fragments d'environ 1600 paires de bases (pb) et 12 sous-  
10 fragments plus petits d'environ 400 à 500 pb. Ces oligonucléotides contiennent les sites de restriction BamHI, XbaI ou XhoI pour faciliter leur clonage. La transcription réverse de l'ARN et l'amplification de l'ADN complémentaire par une réaction d'amplication en chaîne par  
15 polymérase ont été réalisées selon des techniques standards (Sambrook J. et al., Molecular Cloning : a laboratory manual, 2ème éd., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). L'ADN amplifié a été digéré par les enzymes appropriées et cloné dans le vecteur pBluescript (Stratagene, La Jolla, Ca.).

20 Les limites des différents fragments clonés à partir du gène S de la souche 79-1146 du virus FIPV sont indiquées ci-dessous : (toutes les positions font référence à la séquence du gène S de la souche FIPV 79-1146 publiée par De Groot R. et al. (J. Gen. Virol. 1987, 68, 2639-2646)).

25 Fragment F1 : nucléotides 70 à 1736.  
Fragment F2 : nucléotides 1519 à 3160.  
Fragment F3 : nucléotides 2773 à 4428.  
Fragment S1 : nucléotides 70-535.  
Fragment S2 : nucléotides 394-862.  
30 Fragment S3 : nucléotides 742-1221.  
Fragment S4 : nucléotides 1045-1539.  
Fragment S5 : nucléotides 1339-1734.  
Fragment S6 : nucléotides 1594-2089.  
Fragment S7 : nucléotides 1963-2443.

Fragment S8 : nucléotides 2296-2838.  
Fragment S9 : nucléotides 2743-3004.  
Fragment S10 : nucléotides 2890-3506.  
Fragment S11 : nucléotides 3352-4063.  
5 Fragment S12 : nucléotides 3895-4428.

Les différents fragments FIPV clonés ont ensuite été isolés des clones Bluescript par digestion NotI et XhoI, puis reclés dans le vecteur pTOPE-SX pour l'étape  
10 de transcription et de traduction *in vitro*.

La construction de pTOPE-SX est décrite ci-dessous :

Le plasmide pTOPE-1b(+) (Novagen) contient le  
15 promoteur T7 et une partie du gène 10 du phage T7 suivie d'un polylinker. Ce polylinker a été entièrement éliminé par digestion avec les enzymes de restriction SacII et XhoI et remplacé par le fragment SacII-XhoI de 82 pb isolé du polylinker contenu dans pBluescript. Un nucléotide  
20 supplémentaire a été ajouté à ce fragment de manière à mettre tous les fragments FIPV clonés dans pBluescript en phase avec la phase du gène 10. Le nouveau plasmide a été appelé pTOPE-SX. La transcription et la traduction *in vitro* avec l'ARN polymérase du phage T7 des inserts contenus dans  
25 pTOPE-SX permet d'obtenir des protéines de fusion contenant 260 acides aminés de la protéine du gène 10 suivis des acides aminés codés par les inserts FIPV.

**Exemple 2 : Reconnaissance des peptides FIPV S**  
30 par les anticorps monoclonaux.

Dans le but de localiser la région générale du gène S du virus FIPV responsable de la neutralisation et de la facilitation, des fragments chevauchants de ce gène ont été clonés par PCR dans le vecteur pBluescript sous la



forme de trois grands fragments (F1, F2 et F3 ; figure 1) et de 12 petits sous-fragments (S1 à S12). Ces inserts FIPV ont ensuite été sous-clonés dans le vecteur pTOPE-SX en vue de leur transcription et de leur traduction *in vitro*.

5 Les réactions couplées de transcription et de traduction *in vitro* ont été réalisées en utilisant le système "TNT Reticulocyte Lysate" (Promega, Madison, WI) selon la technique recommandée par le fabricant en présence de <sup>35</sup>S-méthionine (Amersham France). Pour étudier l'effet  
10 de la maturation post-traductionnelle des protéines, les réactions ont également été réalisées en présence de membranes microsomales pancréatiques de chien (Promega). Les produits de traduction ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS et révélés par  
15 autoradiographie.

Les essais de radio-immunoprecipitation (RIPA) ont été effectués en mélangeant 5 µl du mélange de traduction de la protéine de fusion avec 5 µl d'anticorps monoclonal ou de sérum de chat dans 200 µl de tampon TNE  
20 Triton X-100 (NaCl 150 mM, Tris (pH 8,0) 50 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0,1 %) et en agitant ce mélange à +4°C pendant 1 heure sous agitation. Des sérums de chat positifs et négatifs pour FIPV ainsi qu'un monoclonal dirigé contre les  
25 10 premiers acides aminés de la protéine du gène 10 de T7 (anticorps monoclonal T7 Tag, Novagen) ont été utilisés comme contrôles. Les immuns complexes sont adsorbés par addition de 50 µl d'un conjugué agarose-protéine G recombinante (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) aux  
30 échantillons contenant les anticorps monoclonaux ou par addition de 50 µl d'un conjugué agarose-protéine A recombinante (Boehringer Mannheim) aux échantillons contenant les sérums de chats. Les immuns complexes fixés sur l'agarose ont été centrifugés pendant 30 s et lavés deux fois en tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8,0),

1 % Triton X-100, 0,5 % sodium désoxycholate, 0,1 % SDS) et une fois avec le tampon Tris-Triton (10 mM Tris (pH 8,0), 0,1 % Triton X-100). Les échantillons centrifugés sont ensuite séparés par électrophorèse. Les gels sont fixés et  
5 traités avec une solution d'Amplify (Amersham) et révélés par autoradiographie.

Les grands fragments F1, F2 et F3 ont une taille d'environ 62 kDa, ce qui donne des protéines de fusion d'environ 90 kDa correspondant effectivement aux tailles  
10 observées. Les petits fragments S1 à S12 ont des tailles d'environ 18 kDa, ce qui donne des protéines de fusion d'environ 46 kDa.

Pour optimiser les conditions de reconnaissance des peptides de fusion FIPV S par les anticorps  
15 monoclonaux, les protéines de fusion ont été également traduites en présence de membranes microsomales de pancréas de chien. La glycosylation de l'extrémité N-terminale de S (fragment F1) se traduit par un changement de la taille de la protéine de fusion F1 de 90 kDa à 98 kDa ou 145 kDa  
20 correspondant respectivement à un accroissement de 8 ou de 55 kDa. Une augmentation de 8 kDa est également observée pour la taille du sous-fragment S1 qui passe de 48 à 54 kDa. La taille des autres fragments FIPV S n'est pas modifiée par la traduction effectuée en présence de  
25 membranes microsomales.

Les anticorps monoclonaux spécifiques anti-FIPV S 23F4.5, 24H5.4 et 18A7.4 (Corapi W. et al., J. Virol. 1992, 66, 6695-6705) reconnaissent le fragment F2 et le sous-fragment S6 qui ont en commun une séquence de 165 acides aminés (positions 509 à 673 sur la séquence de la protéine  
30 S de la souche 79-1146 (De Groot R. et al., J. Gen. Virol. 1987, 68, 2639-2646). La reconnaissance du fragment F2 n'est pas améliorée par l'utilisation de protéines traduites en présence de membranes microsomales, ce qui

suggère que la glycosylation n'est pas nécessaire pour la reconnaissance des épitopes recherchés.

Exemple 3 : Séquençage des virus mutants  
5 résistants à la neutralisation par les anticorps  
monoclonaux anti-FIPV S (mutants "mar").

Pour localiser les sites antigéniques localisés  
sur le fragment S6, la région S6 de plusieurs mutants FIPV  
mar a été amplifiée par PCR et clonée dans le vecteur  
10 pBluescript SK+ et séquencée. La séquence des mutants mar a  
été établie sur des mutants mar indépendants obtenus avec  
le même monoclonal aussi bien qu'avec des clones issus  
d'amplifications PCR indépendantes avec le même mutant mar.  
La séquence de chaque clone a été établie sur les deux  
15 birns en utilisant le kit Sequenase (Amersham) selon la  
technique recommandée par le fabricant.

Les séquences obtenues ont été comparées avec la  
séquence homologue du virus parental 79-1146. Les mutants  
mar analysés sont les mutants identifiés mar 23F4.5, mar  
20 18A7.4 et mar 24H5.4. Ces mutants ont été obtenus  
respectivement avec les anticorps monoclonaux 23F4.5,  
18A7.4 et 24H5.4 décrits par C. Olsen (Olsen C. et al., J.  
Virology 1992, 66, 956-965) et W. Corapi (Corapi W. et al.,  
J. Virology 1992, 66, 6695-6705).

25 Le monoclonal 23F4.5 possède un titre  
neutralisant de 20480 (Corapi, 1992) et induit une  
facilitation de l'infection *in vitro* d'au moins 100 fois le  
niveau normal (Olsen, 1992). Le mutant mar 23F4.5 présente  
des mutations aux positions 1840 et 2014 qui induisent des  
30 changements d'acides aminés dans la séquence de la protéine  
S pour les résidus 591 (Asp -> Tyr) et 649 (Arg -> Gly).  
Le monoclonal 18A7.4 possède un titre neutralisant de 5120  
et induit une facilitation de l'infection *in vitro* d'au  
moins 100 fois le niveau normal. Le mutant mar 18A7.4

présente des mutations aux positions 1772 et 2036 qui induisent des changements d'acides aminés pour les résidus 568 (Asp -> Val) et 656 (Arg -> Lys).

5 Le monoclonal 24H5.4 possède un titre neutralisant de 96 et il a la particularité de ne pas induire de facilitation de l'infection (Olsen, 1992). Le mutant *mar* 24H5.4 présente une seule mutation à la position 1996 qui induit un changement d'acide aminé pour le résidu 643 (Asp -> Tyr).

10

#### Exemple 4 : Mutagénèse du site A1.

Le fragment central du gène FIPV S HindIII-HindIII de 1723 pb (nucléotides 1696 à 3418) est cloné dans le vecteur pBS-SK+ pour donner le plasmide pFIPV-S2. Le site A1 est situé sur le sous-fragment HindIII-SspI 15 (positions 1696 à 1845) de ce fragment. Le site A1 est mutagénisé par PCR en utilisant la stratégie suivante :

Les oligonucléotides suivants sont synthétisés :

20 OLIGO A11 (95 mer) (SEQ ID NO: 1) =

5'ATGAAGCTTAGTGGTTATGGTCAACCCATAGCCTCGACACTAAGTAACATCACACTA  
CCAATGCAGGATAACAATACTGTTGTGTACTGTATTTCG 3'

25 OLIGO A12 (88 mer) (SEQ ID NO: 2) =

5'AAAAATATTGTACCATAAAGAACTTTTGCAAGTGGAATGAACATAAACTGAGAATTG  
GTTAGAACGAATACAGTACACAACAGTATTG 3'

30 OLIGO A13 (20 mer) (SEQ ID NO: 3) =

5' ATGAAGCTTAGTGGTTATGG 3'

OLIGO A14 (20 mer) (SEQ ID NO: 4) =

5' AAAAATATTGTACCATAAAG 3'

Les oligonucléotides A11 et A12 sont hybridés entre eux grâce à leur séquence complémentaire commune de 23 paires de bases. L'hybride ainsi obtenu sert alors, après élongation de ses extrémités 3', de matrice pour une réaction PCR utilisant les oligonucléotides A13 et A14. Cette réaction d'amplification par PCR permet d'obtenir un fragment de 159 pb. Ce fragment est alors digéré avec les enzymes de restriction HindIII et SspI pour produire un fragment HindIII-SspI de 149 pb (fragment A). Ce fragment contient le site A1 modifié à deux positions (Val au lieu de Asp à la position 568 et Tyr au lieu de Asp à la position 591). Le plasmide pFIPV-S2 est digéré par HindIII et digéré partiellement par SspI pour isoler le fragment SspI-HindIII de 1569 pb (fragment B) par Geneclean (BI0101 Inc., La Jolla, Ca.). Le vecteur pBS-SK+ est digéré par HindIII et déphosphorylé pour produire le fragment C (2960 pb).

Les fragments A, B et C sont alors ligaturés ensemble pour produire le plasmide pFIPSA1\*. Ce plasmide contient le fragment HindIII-HindIII du gène FIPV S modifié pour deux acides aminés du site A1.

Le gène FIPV S est ensuite reconstitué en remplaçant par simple clonage le fragment HindIII-HindIII naturel (positions 1696 à 3418) par le fragment HindIII-HindIII contenu dans le plasmide pFIPSA1\*. Le gène complet FIPV S modifié au site A1 peut alors être utilisé pour les constructions de plasmides d'expression ou de virus recombinants.

#### Exemple 5 : Mutagenèse du site A2.

Les oligonucléotides suivants sont synthétisés :

OLIGO A21 (20 mer) (SEQ ID NO: 5) =

5' GGACAATATTTTAAATCAAG 3'

5

OLIGO A22 (36 mer) (SEQ ID NO: 6)

5' TTTAACAACCTGCTCATTGGTTCCTGTACGTGCAGC 3'

10

OLIGO A23 (36 mer) (SEQ ID NO: 7) =

5' AAGTTTTATGTTGCTGCACGTACAGGAACCAATGAG 3'

OLIGO A24 (20 mer) (SEQ ID NO: 8) =

15

5' ATCACTAACATTTTAAAGC 3'

20 Une réaction PCR (PCR A) est réalisée avec les oligonucléotides A21 et A22 et avec le plasmide pFIPV-S2 comme matrice pour synthétiser un fragment PCR de 199 pb (fragment A).

25 Une réaction PCR (PCR B) est réalisée avec les oligonucléotides A23 et A24 et avec le plasmide pFIPV-S2 comme matrice pour donner un fragment PCR de 273 pb (fragment B).

30 Les fragments PCR A et B sont hybridés entre eux grâce à leur région complémentaire de 46 pb et le produit de cette hybridation, après élongation des extrémités 3', est amplifié par une réaction PCR (PCR C) avec les oligonucléotides A21 et A24 pour donner un fragment PCR de 424 pb. Ce fragment PCR est alors digéré par SspI et DraI pour donner le fragment de restriction SspI-DraI de 402 pb (fragment C).

Le plasmide pFIPV-S2 est digéré par HindIII et

SspI pour isoler le fragment HindIII-SspI de 149 pb (fragment D).

Le plasmide pFIPV-S2 est digéré par HindIII et DraI pour isoler le fragment de restriction DraI-HindIII de 1170 pb (fragment E). Le vecteur pBS-SK+ est digéré par HindIII et déphosphorylé pour donner le fragment F (2960 pb).

Les fragments C, D, E et F sont ligaturés ensemble pour donner le plasmide pFIPSA2\*. Le fragment central HindIII-HindIII 1723 pb du gène FIPV S contenu dans pFIPSA2\* possède un site A2 modifié au niveau de 3 acides aminés (Tyr au lieu de Asp à la position 643, Gly au lieu de Arg à la position 649, et Lys au lieu de Arg à la position 656).

Le gène FIPV S est ensuite reconstitué en remplaçant par simple clonage le fragment HindIII-HindIII naturel (positions 1696 à 3418) par le fragment HindIII-HindIII contenu dans le plasmide pFIPSA2\*. Le gène complet FIPV S modifié au site A2 peut alors être utilisé pour les constructions de plasmides d'expression ou de virus recombinants.

#### Exemple 6 : Mutagenèse des sites A1 et A2.

Les fragments A (exemple 4), C et E (exemple 5) sont ligaturés avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par HindIII et déphosphorylé, pour donner le plasmide pFIPSA1\*A2\*. Le fragment central HindIII-HindIII 1723 pb du gène FIPV S contenu dans pFIPSA1\*A2\* présente 2 changements d'acides aminés au niveau du site A1 (voir exemple 4) et 3 changements d'acides aminés au niveau du site A2 (voir exemple 5).

Le gène FIPV S est ensuite reconstitué en remplaçant par simple clonage le fragment HindIII-HindIII naturel par le fragment HindIII-HindIII 1723 pb contenu

dans pFIPSA1\*A2\*. Le gène complet FIPV S comprenant des modifications au niveau des sites A1 et A2 peut alors être utilisé pour la construction de plasmides d'expression ou de virus recombinants.

5                   Exemple 7 : Construction de délétions au niveau des sites A1 et A2.

10                   Selon la stratégie de clonage décrite précédemment (mutagénèse par utilisation de réactions PCR), des délétions respectant la phase de lecture du gène FIPV S peuvent être introduites au niveau des sites A1 et/ou A2. Selon le même schéma que décrit précédemment (voir exemple 6), on peut construire un fragment central HindIII-HindIII du gène FIPV S présentant une délétion dans le site A1 et/ou une délétion dans le site A2.



## REVENDEICATIONS

1. Séquence nucléotidique comprenant le gène FIPV S, présentant au moins une modification
  - dans la région antigénique A1 qui code pour les acides aminés 562 à 598 de manière que la protéine exprimée présente un épitope modifié de telle sorte qu'elle n'induisse plus d'anticorps facilitants, et/ou
  - dans la région antigénique A2 qui code pour les acides aminés 637 à 662 de manière que la protéine exprimée n'induisse plus d'anticorps facilitants.
2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la modification dans la région antigénique A2 est telle que la protéine exprimée présente un épitope modifié de telle sorte qu'elle n'induisse plus d'anticorps facilitants.
3. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou 2, comprenant une mutation dans l'un au moins des codons codant pour Asp 568 et Asp 591.
4. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 3, comprenant une délétion de l'un au moins des codons codant pour les acides aminés 568 et 591.
5. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant une délétion incluant l'un au moins des codons codant pour les acides aminés 568 et 591.
6. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant une mutation dans l'un au moins des codons codant pour Asp 643, Arg 649 et Arg 656.
7. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant une délétion de l'un au moins des codons codant pour les acides aminés 643, 649 et 656.
8. Séquence nucléotidique selon la revendication

7, comprenant une délétion incluant l'un au moins des codons codant pour les acides aminés 643, 649 et 656.

9. Polypeptide exprimé par l'une des séquences selon les revendications 1 à 8.

5 10. Utilisation des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour la construction de virus recombinants ou de plasmides d'expression.

10 11. Vaccin comprenant un virus recombinant exprimant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 8 pour la vaccination des chats contre la péritonite infectieuse féline.

15 12. Composition pour la vaccination contre la péritonite infectieuse féline comprenant une préparation de plasmides d'expression contenant une séquence selon l'une des revendications 1 à 8 dans un véhicule susceptible de permettre l'injection directe desdits plasmides chez le chat.

20 13. Vaccin comprenant au moins une protéine FIPV S modifiée sous forme du polypeptide selon la revendication 9.

- 25 -

RHONE MERIEUX

DARTEIL Raphael - CORAPI Wayne - AUDONNET Jean-Christophe -  
Francis - CHAPPUIS Gilles-Emile

5 L'invention comprend les séquences nucléotidiques  
comprenant le gène FIPV S, ou un fragment de ce gène,  
modifiées dans l'une au moins des régions antigéniques A1  
et A2 impliquées dans la facilitation, ainsi que  
l'utilisation de ces séquences pour l'expression de  
protéines modifiées, et pour la construction de virus  
10 recombinants ou de plasmides d'expression, et l'utilisation  
des virus recombinants comme vaccins contre la péritonite  
infectieuse féline, l'utilisation des plasmides  
d'expression comme composition immunisante par injection  
directe desdits plasmides chez le chat, et l'utilisation  
15 des protéines modifiées comme vaccin.

Figure néant

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 95/01128

|   |  |   |
|---|--|---|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 6 C12N15/50 C07K14/165 A61K39/215   |  |   |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 6 C07K C12N A61K  |  |   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |  |   |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  |  |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |   |
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |
| X   | WO, A, 93 23422 (SMITHKLINE BEECHAM CORP<br>; MILLER TIMOTHY J (US); KLEPPER SHARON<br>(US) 25 November 1993<br>see page 9, line 31 - page 11, line 14<br>see page 22, line 5 - line 29<br>see page 26 - page 31<br>see examples 7-10<br>---   | 1, 2, 4, 5,<br>7-13   |
| A   | JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY,<br>vol. 74, READING GB,<br>pages 745-749,<br>OLSEN, C. ET AL. 'Identification of<br>antigenic sites mediating<br>antibody-dependent enhancement of feline<br>infectious peritonitis virus infectivity'<br>cited in the application<br>see the whole document<br>---<br><div style="text-align: right;">-/--</div> | 1-13  |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>   |  |   |
| * Special categories of cited documents :<br><div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p> </div> </div> |  |   |
| Date of the actual completion of the international search<br><br><div style="text-align: center;">10 January 1996</div>   |  | Date of mailing of the international search report<br><br><div style="text-align: center;">16. 01. 96</div> |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax (+ 31-70) 340-3016   |  | Authorized officer<br><br><div style="text-align: center;">Andres, S</div>                                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/FR 95/01128

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A        | JOURNAL OF VIROLOGY,<br>vol. 66, no. 11,<br>pages 6695-6705,<br>CORAPI, W. ET AL. 'Monoclonal antibody<br>analysis of neutralization and<br>antibody-dependent enhancement of feline<br>infectious peritonitis virus'<br>cited in the application<br>see the whole document<br>----                   | 1-13                  |
| A        | JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY,<br>vol. 68, no. 10, READING GB,<br>pages 2639-2646,<br>DE GROOT, R. ET AL. 'cDNA cloning and<br>sequence analysis of the gene encoding the<br>peplomer protein of feline infectious<br>peritonitis virus'<br>cited in the application<br>----                            |                       |
| P,X      | WO,A,95 07987 (SOLVAY ;BUBLOT MICHEL (FR);<br>WANNEMAEKER CATHERINE DE (BE); COLAU D) 23<br>March 1995<br>see page 5, line 4 - page 17<br>see examples 15,16,19<br>see claims<br>----   | 1-13                  |
| P,X      | JOURNAL OF VIROLOGY,<br>vol. 69, no. 5, May 1995<br>pages 2858-2862,<br>CORAPI, W. ET AL. 'Localization of<br>antigenic sites of the S glycoprotein of<br>feline infectious peritonitis virus<br>involved in neutralization and<br>antibody-dependent enhancement'<br>see the whole document<br>----- | 1-9                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01128

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9323422                              | 25-11-93            | AU-B- 4240493              | 13-12-93            |
|   |                     | AU-B- 4241093              | 13-12-93            |
|   |                     | CA-A- 2135201              | 25-11-93            |
|   |                     | EP-A- 0640096              | 01-03-95            |
|   |                     | EP-A- 0640097              | 01-03-95            |
|   |                     | JP-T- 7508176              | 14-09-95            |
|   |                     | WO-A- 9323421              | 25-11-93            |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| WO-A-9507987                              | 23-03-95            | GB-A- 2282601              | 12-04-95            |
|   |                     | AU-B- 7615894              | 03-04-95            |
| -----                                     |                     |                            |                     |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No  
PCT/FR 95/01128

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/50 C07K14/165 A61K39/215

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| X           | WO, A, 93 23422 (SMITHKLINE BEECHAM CORP<br>; MILLER TIMOTHY J (US); KLEPPER SHARON<br>(US) 25 Novembre 1993<br>voir page 9, ligne 31 - page 11, ligne 14<br>voir page 22, ligne 5 - ligne 29<br>voir page 26 - page 31<br>voir exemples 7-10<br>---  | 1, 2, 4, 5,<br>7-13           |
| A           | JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY,<br>vol. 74, READING GB,<br>pages 745-749,<br>OLSEN, C. ET AL. 'Identification of<br>antigenic sites mediating<br>antibody-dependent enhancement of feline<br>infectious peritonitis virus infectivity'<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier<br>---<br>-/- | 1-13                          |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 Janvier 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16.01.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. e Internationale No  
PCT/FR 95/01128

| C.(note) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |   |                               |
|--|---|-------------------------------|
| Categorie                                      | Identification des documents cites, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
| A  | <p>JOURNAL OF VIROLOGY,<br/>vol. 66, no. 11,<br/>pages 6695-6705,<br/>CORAPI, W. ET AL. 'Monoclonal antibody<br/>analysis of neutralization and<br/>antibody-dependent enhancement of feline<br/>infectious peritonitis virus'<br/>cité dans la demande<br/>voir le document en entier<br/>---</p>                        | 1-13                          |
| A  | <p>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY,<br/>vol. 68, no. 10, READING GB,<br/>pages 2639-2646,<br/>DE GROOT, R. ET AL. 'cDNA cloning and<br/>sequence analysis of the gene encoding the<br/>peplomer protein of feline infectious<br/>peritonitis virus'<br/>cité dans la demande<br/>---</p>                                      |                               |
| P,X  | <p>WO,A,95 07987 (SOLVAY ;BUBLLOT MICHEL (FR);<br/>WANNEMAEKER CATHERINE DE (BE); COLAU D) 23<br/>Mars 1995<br/>voir page 5, ligne 4 - page 17<br/>voir exemples 15,16,19<br/>voir revendications<br/>---</p>   | 1-13                          |
| P,X  | <p>JOURNAL OF VIROLOGY,<br/>vol. 69, no. 5, Mai 1995<br/>pages 2858-2862,<br/>CORAPI, W. ET AL. 'Localization of<br/>antigenic sites of the S glycoprotein of<br/>feline infectious peritonitis virus<br/>involved in neutralization and<br/>antibody-dependent enhancement'<br/>voir le document en entier<br/>-----</p> | 1-9                           |



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dern. Internationale No

PCT/FR 95/01128

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO-A-9323422                                    | 25-11-93               | AU-B- 4240493                           | 13-12-93               |
|   |                        | AU-B- 4241093                           | 13-12-93               |
|   |                        | CA-A- 2135201                           | 25-11-93               |
|   |                        | EP-A- 0640096                           | 01-03-95               |
|   |                        | EP-A- 0640097                           | 01-03-95               |
|   |                        | JP-T- 7508176                           | 14-09-95               |
|   |                        | WO-A- 9323421                           | 25-11-93               |
| -----   |                        |   |                        |
| WO-A-9507987                                    | 23-03-95               | GB-A- 2282601                           | 12-04-95               |
|   |                        | AU-B- 7615894                           | 03-04-95               |
| -----   |                        |   |                        |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**